

© М.З.Гасанов, М.М.Батюшин, В.П.Терентьев, Н.А.Садовническая, 2013
УДК [616.611-002+616.61-006.6]:616-003.261

М.З. Гасанов¹, М.М. Батюшин², В.П. Терентьев¹, Н.А. Садовническая³

ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ У ПАЦИЕНТОВ С ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ И РАКОМ ПОЧКИ

M.Z. Gasanov, M.M. Batyushin, V.P. Terentyev, N.A. Sadovnichaya

PROTEOMIC URINE EXAMINATION OF PATIENTS WITH GLOMERULONEPHROPATHY AND RENAL CANCER

¹Кафедра внутренних болезней №1, ²кафедра внутренних болезней №2, ³нефрологическое отделение клиники Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Поиск неинвазивных методов диагностики возникновения и развития хронического гломерулонефрита (ХГН) на основе анализа результатов стандартных методов и протеомного исследования мочи. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В исследование включены 60 пациентов, которые были разделены на две группы. В первую группу были включены 30 пациентов с раком почки (РП). Средний возраст $52,8 \pm 2,6$ года. Морфологические варианты рака почки были представлены тремя формами: светлоклеточный рак ($n=15$), папиллярный рак ($n=9$) и хромофобный рак почки ($n=6$). Во вторую группу вошли 30 пациентов с ХГН (18 мужчин и 12 женщин), средний возраст $37,2 \pm 1,3$ года. По результатам нефробиопсии в группе пациентов с ХГН были выявлены следующие морфологические варианты: IgA-нефропатия ($n=12$); мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (МППГН, $n=7$), фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС, $n=5$), болезнь минимальных изменений (липоидный нефроз) (ЛН, $n=4$), мембранозный гломерулонефрит (МГН, $n=2$). Группу контроля составили практически здоровые люди, средний возраст $52,1 \pm 1,8$ года. Всем пациентам были выполнены общеклинические методы исследования (УЗИ почек, общий анализ крови, общий анализ мочи, концентрация креатинина и мочевины крови) и масс-спектрометрия мочи. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Выявлены клинико-лабораторные признаки ХГН: АГ, анемия, азотемия, гипопротеинемия, гипоальбуминемия, гиперхолестеринемия, гиперкоагуляция, гипергидратация, протеинурия, микро- или макрогематурия, лимфоцитурия, цилиндрурия, снижение скорости клубочковой фильтрации. Выделены функциональные группы новых белков, составивших молекулярные профили мочи пациентов с ХГН, объясняющие механизмы развития анемии, иммунновоспалительного процесса, гипоксии и ангиогенеза в почечной паренхиме. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Анализ протеомного спектра мочи пациентов с ХГН и РП позволяет разделить белковый спектр на условные группы, что дает возможность определить полученные белки в качестве потенциальных чувствительных и специфичных маркеров возникновения и прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, протеомика, молекулярные маркеры.

ABSTRACT

AIM. Search of noninvasive methods of diagnostics of chronic glomerulonephritis (CGN) emergence and progression based on outcome analyses of standard methods and proteomic urine examination. **PATIENTS AND METHODS.** The study included 60 patients which were divided into two groups. First group included 30 patients with renal cancer (RC). Average age $52,8 \pm 2,6$ years. Morphologic variants of renal cancer were presented by three forms: clear-cell carcinoma ($n=15$), papillary carcinoma ($n=9$) and chromophobe carcinoma ($n=6$). Second group included 30 patients with CGN (18 male and 12 female), average age $37,2 \pm 1,3$ years. According to results of nephrobiopsy in group of patients with CGN were revealed following morphologic variants: IgA-nephropathy ($n=12$); membranous proliferative glomerulonephritis (MPGN, $n=7$), focal segmental glomerulosclerosis (FSGS, $n=5$), minimal change disease (lipoid nephrosis) (LN, $n=4$), membranous glomerulonephritis (MGN, $n=2$). Control group was formed from practically healthy people, average age $52,1 \pm 1,8$ years. To all patients were carried out general research methods (kidneys ultrasound, general blood analysis, general urine analysis, creatinine and blood urea concentration) and mass spectrometry of urine. **RESULTS.** Were revealed clinical and laboratory signs of CGN: arterial hypertension, anem, azotemia, hypoproteinemia, hypoalbuminemia, hypercholesterinemia, hypercoagulation, hyperhidration, proteinuria, micro- and macrohematuria, lymphocyteuria, cylindruria, decrease of glomerular filtration rate. Were revealed functional groups of new proteins which composed molecular profiles of patients with CGN explaining mechanisms of anemia progression, immune-inflammatory process, hypoxia and angiogenesis in renal parenchyma. **CONCLUSION.** Analysis of proteomic urine spectrum of patients with CGN and RC provides to divide protein spectrum into conditional groups. It provides to identify received proteins as potential sensitive and specific markers of disease emergence and progression.

Key words: chronic glomerulonephritis, proteomics, molecular markers.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы представленного исследования объясняется повышенным интересом к проблеме дифференциальной диагностики различных гломерулопатий, в первую очередь, из-за отсутствия высокоспецифичных диагностических критериев, патогномичных признаков и молекулярных маркеров заболевания [1]. Несмотря на достигнутые успехи в диагностике заболеваний почек и, в частности, нефритов число диагностических ошибок остается высоким. Так, в 2011 году процент ошибок диагностики хронического гломерулонефрита (ХГН) среди заболеваний внутренних органов в терапевтических стационарах в отдельных случаях достигал 75% [2]. Несомненно, это приводит к поздней диагностике, неадекватной терапии и, как следствие, ухудшению прогноза заболевания. В последние десятилетия в мире наблюдается неуклонный рост распространенности хронических заболеваний почек. Так, в 2012 году в общей популяции доля таких пациентов составила около 11%, при том, что распространенность ХГН не столь высока и составляет 50 случаев на 10 000 населения [3, 4]. Все это повышает риск прогрессирования дисфункции почек и приводит к существенному снижению качества жизни, трудоспособности и инвалидизации населения. Необходимо отметить, что среди основных причин развития вторичных гломерулонефритов рак почки занимает одно из первых мест [5]. Выделяемые опухолью биологически активные вещества приводят к развитию паранеопластического синдрома, а изменения в моче маскируются клинической картиной гломерулонефрита. По данным Дж.П. Рич [6], заподозрить рак почки при ХГН по паранеопластическим проявлениям, в том числе по изменениям в анализе мочи, трудно, в связи с их неспецифичностью. В большинстве случаев диагноз рака почки удается установить только при использовании визуализирующих методов, в том числе радиологических – в 25–40% [7]. За последние 20 лет заболеваемость раком почки увеличилась на 30%, отчасти в связи с тем, что способы первичной неинвазивной дифференциальной диагностики различных форм ХГН разработаны недостаточно [8].

В современной терапевтической практике на этапе первичного звена здравоохранения экспресс-методы диагностики заболевания почек малочисленны и нередко имеют высокую стоимость, а алгоритмы дифференциальной диагностики первичных и вторичных ХГН требуют регулярного пересмотра [9, 10].

Финальным этапом верификации диагноза

ХГН, требующим обязательной госпитализации в специализированное нефрологическое отделение, является нефробиопсия, как обязательное и наиболее достоверное исследование, с помощью которого возможно точно установить диагноз [11]. Вместе с тем, использование неинвазивных методик и инновационных технологий могло бы способствовать более ранней диагностике и более строгому прогнозированию риска развития почечной патологии, что позволит своевременно модулировать меры профилактики и лечения [10].

Дифференциальная диагностика первичных и вторичных ХГН является неотъемлемой частью на этапе постановки диагноза. Существующие на сегодняшний день алгоритмы обследования больных данной патологией не в полной мере удовлетворяют потребностям врача и требуют модернизации. Активно ведется поиск неинвазивных биомаркеров поражения почек, которые позволили бы осуществлять мониторинг состояния пациента, оценивать прогноз, определять возможности биотаргетной терапии, а также лучше понять молекулярные основы патогенеза ХГН [11]. В этом аспекте масс-спектрометрия является методом научного анализа, на основании которого можно обнаружить ряд белков, маркирующих различные звенья патогенеза первичных и вторичных ХГН, предположительно позволяющих дифференцировать формы и стадии болезни [12]. Возможность детально изучить «протеомное зеркало» мочи пациентов позволит выявить особенности течения ХГН и оптимизировать дифференциальную диагностику [13, 14].

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 60 пациентов, которые были разделены на две группы. В первую группу были включены 30 пациентов с морфологически верифицированным раком почки. Средний возраст составил $52,8 \pm 2,6$ года. Морфологические варианты рака почки были представлены тремя формами: светлоклеточный рак ($n=15$), папиллярный рак ($n=9$) и хромофобный рак почки ($n=6$). Во вторую группу вошли 30 пациентов с ХГН (18 мужчин и 12 женщин), средний возраст $37,2 \pm 1,3$ года. По результатам нефробиопсии в группе пациентов с ХГН были выявлены следующие морфологические варианты: IgA-нефропатия ($n=12$); мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (МПГН, $n=7$), фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС, $n=5$), болезнь минимальных изменений (липоидный нефроз) (ЛН, $n=4$), мембранозный гломерулонефрит (МГН, $n=2$). Группу контроля составили относительно

Таблица 1

Показатели лабораторных исследований у пациентов с первичными и вторичными ХГН по сравнению с группой контроля, $X \pm m$

Показатель	Группа пациентов с первичным ХГН (n=30)	Группа пациентов с вторичным ХГН (n=30)	Контрольная группа (n=30)
Общеклинический анализ крови			
Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	3,2 $\pm$ 0,1*	4,7 $\pm$ 0,1*	4,9 $\pm$ 0,5
Гемоглобин, г/л	98,2 $\pm$ 6,8**	138,7 $\pm$ 3,8*	142 $\pm$ 8,4
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	17,2 $\pm$ 2,4**	17,2 $\pm$ 2,9**	9,1 $\pm$ 1,5
Биохимический анализ крови			
Общий белок, г/л	56,3 $\pm$ 3,9*	71,0 $\pm$ 4,9	72,4 $\pm$ 5,2
Креатинин, мкмоль/л	201,9 $\pm$ 32,1**	93,7 $\pm$ 4,4**	83,4 $\pm$ 6,2
Мочевина, мкмоль/л	8,6 $\pm$ 1,2**	8,9 $\pm$ 4,3**	4,3 $\pm$ 0,7
Иммунологическое исследование крови			
Компонент комплемента С3, г/л	1,62 $\pm$ 0,09*	1,34 $\pm$ 0,07*	1,30 $\pm$ 0,1
Компонент комплемента С4, г/л	0,65 $\pm$ 0,06**	0,54 $\pm$ 0,06**	0,30 $\pm$ 0,01
Общеклинический анализ мочи			
Протеинурия, г/сут	2,33 $\pm$ 0,6***	0,04 $\pm$ 0,02*	–
Эритроцитурия	39,1 $\pm$ 6,1***	12,4 $\pm$ 7,1***	–
СКФ, мл/мин/1,73 м ²	61,4 $\pm$ 4,5**	87,7 $\pm$ 5,8*	92,3 $\pm$ 7,8

Примечание. Достоверность различий с контрольной группой: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

здоровые люди, средний возраст которых составил 52,1 $\pm$ 1,8 года. Всем пациентам была выполнена масс-спектрометрия мочи.

У пациентов второй группы верифицированы следующие клинические формы заболевания: латентная форма (16 человек), гипертоническая (6 человек), нефротическая (6 человек), гематурическая (2 человека). У 22 пациентов определяли ХБП I стадии, у 8 – ХБП II стадии. Пациенты обеих групп получали симптоматическое, патогенетическое лечение. В исследовании оценивались следующие стандартные показатели:

а) клинические параметры – наличие отеочного синдрома и артериальной гипертензии (АГ);

б) данные инструментальных методов исследования – УЗИ почек, осмотр глазного дна;

в) показатели лабораторных методов исследования – общий анализ крови; биохимический анализ крови (мочевина, креатинин, общий белок, альбумино-глобулиновый коэффициент, общий холестерин, калий и натрий); общий анализ мочи, анализ мочи по Нечипоренко, суточная протеинурия; определение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле MDRD; коагулограмма; иммунологические показатели (компоненты комплемента С3 и С4; антитела к антистрептолизину О, титр антител к двуспиральной ДНК, цитоплазме нейтрофилов, LE (lupus erythematosus) клеток;

г) показатели иммуноморфологического исследования по результатам пункционной биопсии почек; исследование гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином по Ван-Гизону и Шифф-реактивом; ультраструктурное

исследование почек; иммуноморфологическое исследование почечных биоптатов.

Молекулярное фенотипирование мочи пациентов с ХГН выполнялось на основе протеомных методов исследования, префракционирование/двумерный электрофорез в полиакриламидном геле/MALDI (ионизация лазерной десорбции при содействии матрицы), TOF (время-пролетная), масс-спектрометрия (прибор «Ultraflex II», «Bruker», США). Масс-спектр представляет собой зависимость интенсивности сигнала детектора от отношения массы иона к его заряду (m/z). Биоинформационный анализ межмолекулярных взаимодействий проводился на основе интегрированных баз данных «InterPro», «Entrez», «SWISS-PROT», «OWL», «NRDB», «PROSITE», «PRINTS», «PDB». Обязательным условием включения белка-маркера в диагностический профиль являлся показатель «покрытия сиквенса» при анализе масс-спектрограмм, который составил более 15%. Также учитывался показатель «ожидаемой интенсивности пептидного фингерпринта» («Expect») для каждого обнаруженного белка, представленный в поисковой системе «MascotSearch» (UK). Масс-спектрометрию используют для определения относительной молекулярной массы Мг веществ, которую выражают в атомных единицах массы (а.е.м.) или дальтонах (Da).

Статистическая обработка материала исследования реализована с использованием пакета статистических программ для биомедицинских исследований «Statistica 7.0». Различия считались статистически значимыми при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования у пациентов первой и второй групп были зарегистрированы изменения в лабораторных исследованиях: наличие АГ, анемии, азотемии, гипоальбуминемии, гипопроteinемии, гиперхолестеринемии, гиперкоагуляции, гипергидратации, протеинурии, микро- или макрогематурии, лимфоцитурии, цилиндрурии, снижение СКФ (табл. 1).

Важно отметить, что малосимптомное течение паранеопластического гломерулонефрита приводило к более позднему обращению за специализированной помощью. Так, в 57,6% случаев диагноз рака почки, по данным ультразвукового исследования или компьютерной томографии, соответствовал стадии Т3а по классификации TNM, т.е. опухоль уже распространялась на надпочечник или околопочечные ткани (рис. 1).

На масс-спектрограммах прослеживаются различия по показателю m/z пептидных фрагментов белков мочи в диапазоне молекулярной массы (M_r) – от 1 до 14 килодальтон (кДа), которые позволили уже на этапе графической регистрации диагностических молекулярных паттернов выявить отличия в качественном составе молекул белков мочи у пациентов с ХГН и в группе здоровых лиц (рис. 2 и 3).

Анализ результатов MALDI-TOF-TOF-MS пептидных фрагментов белков мочи в утреннее время суток в контрольной группе здоровых лиц и в исследуемых группах пациентов с ХГН выявил различную частоту обнаружения молекул белков мочи разного M_r . На основе анализа частоты выявления молекул белков мочи разного M_r нами были разработаны и рекомендованы к внедрению в клиническую практику диагностические маркеры и паттерны возникновения и прогрессирования

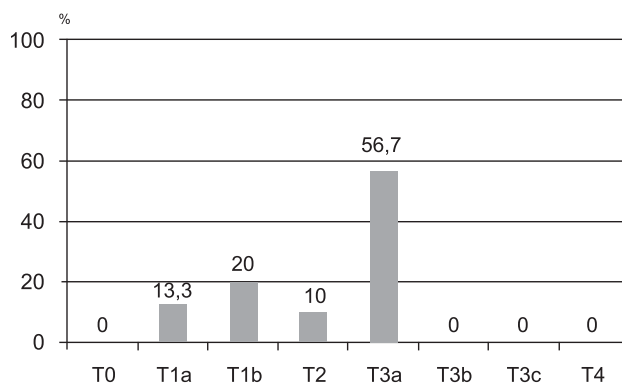


Рис. 1. Распределение больных в группе с вторичными ХГН в зависимости от размера опухоли и распространенности процесса (TNM).

поражения почечной ткани при ХГН. Обнаружены различия в качественном составе спектра белков мочи и в абсолютном количестве у здоровых лиц и пациентов с ХГН и раком почки, у которых представлена экспрессия белков мочи разных функциональных групп (табл. 2).

Различия в качественном составе спектра белков мочи у здоровых лиц контрольной группы и спектра белков мочи у пациентов с ХГН исследуемой группы состояли в следующем: обнаружена экспрессия белков лактатдегидрогеназы А, компонента С4В, β -дефензина-1, уромодулина в протеомном спектре мочи у исследуемой группы пациентов с ХГН, которая не выявлялась в протеомном спектре мочи в контрольной группе здоровых лиц. В протеомном спектре мочи у здоровых лиц отмечалась экспрессия ретинолсвязывающего белка, трансферрина, пируваткиназы (мышечная форма), которая не регистрировалась в молекулярном спектре мочи у пациентов с ХГН. В ходе протеомного анализа нами были выделены функциональные группы новых белков, составивших молекулярные профили мочи у пациентов с ХГН в стадии сохранной функции

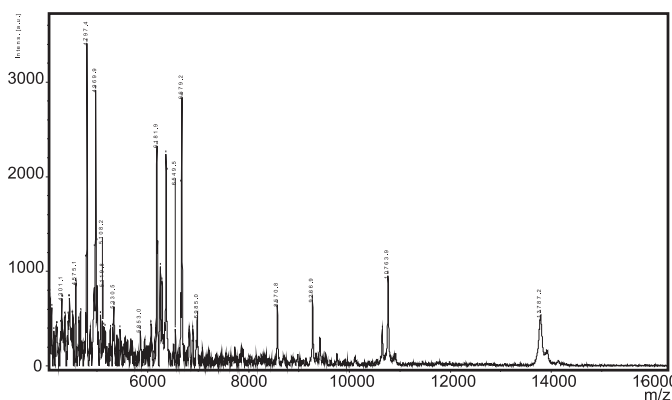


Рис. 2. Пример масс-спектрограммы пептидных фрагментов и белков мочи у здорового человека Н., 52 лет (диапазон M_r = 1-4 кДа).

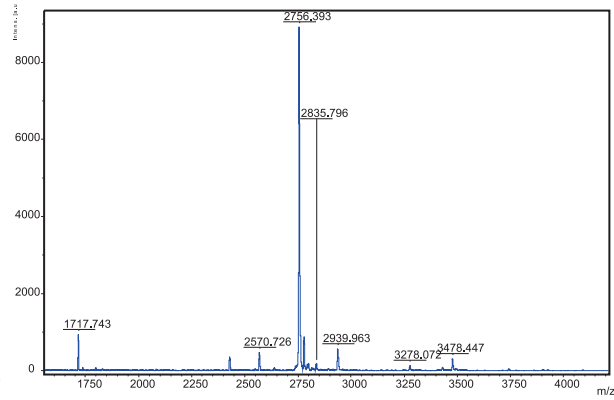


Рис. 3. Пример масс-спектрограммы пептидных фрагментов и белков мочи у пациента А., 65 лет. Светлоклеточный рак почки Т3А, низкодифференцированный, папиллярная форма, тип 1 (диапазон M_r = 4-18 кДа).

Таблица 2

**Профиль белков-маркеров хронического гломерулонефрита и рака почки
в моче у пациентов исследуемых групп**

№	Название белка-маркера	Mr, Да	Контроль (n=30)	I группа ХГН (n=30)	Δ%*	II группа до операции (n=30)	Δ%**	Δ%***	II группа после операции (n=30)	Δ%****	Δ%*****
1	Толлоидоподобный белок 2	12 014	17	6	-64,7	—	—	—	—	—	—
2	Бетаин-гомоцистеинметил- трансфераза 2	21 738	0	0	—	15	100	100	25	40	100
3	МетилСрG-связывающий белок 2, изоформа В	43 255	25	17	-32	6	50	-76	16	-50	-36
4	Матриксная металлопротеи- наза 9	78 458	0	0	—	30	100	100	15	-100	100
5	Матриксная металлопротеи- наза 2	72 000	0	0	—	30	100	100	18	-67	100
6	β ₂ -микроглобулин	13 715	0	0	—	30	100	100	29	-4	100
7	Эритропоэтин	21 307	5	0	—	15	100	66,7	12	-25	59
8	Рецептор к эпидермальному фактору роста	7 519	1	0	—	24	100	95,8	15	-38	94
9	Кадгерин 1	99 694	0	0	—	30	100	100	24	-25	100
10	Глицин-амидинотрансфераза	48 455	28	12	-34	10	-20	-180	17	42	-65
11	Аргининосукцинат-синтетаза	24 180	0	0	—	3	100	100	6	50	100
12	Кальбиндин 1	28 000	0	0	—	9	100	100	6	-50	100
13	Агматиназа	37 660	12	9	-34	5	-80	-140	10	50	-17
14	Глутатион-S-трансфераза	23 356	0	0	—	15	100	100	9	-67	100
15	Лактатдегидрогеназа А	36 689	0	5	100	9	45	100	6	-50	100
16	Комплемент С4В	192 793	0	8	100	6	-34	100	6	0	100
17	Опухоль-ассоциированный ингибитор трипсина	8 507	0	0	—	30	100	100	15	-100	100
18	Пероксиредоксин 1	22 110	0	0	—	18	100	100	9	-100	100
19	Аннексин А5	35 937	0	0	—	15	100	100	9	-67	100
20	β-дефензин-1	7 400	0	12	100	18	34	100	9	-100	100
21	Кальпаин 11	84 423	0	0	—	6	100	100	3	-100	100
22	Уромодулин	69 761	0	11	100	12	9	100	0	0	0
23	Энолаза 2	47 269	0	0	—	9	100	100	6	-50	100
24	Аннексин А4	36 000	0	0	—	12	100	100	6	-100	100
25	Цистатин В	11 140	0	0	—	9	100	100	9	0	100
26	Альдолоза С	22 329	0	0	—	9	100	100	9	0	100
27	Фибронектин	13 341	0	0	—	12	100	100	6	0	100
28	Ретинол-связывающий белок	15 800	1	0	0	9	100	89	6	-50	84
29	Трансферрин	77 064	4	0	0	12	100	67	6	-100	34
30	Пируват-киназа, мышечная форма	40 190	2	0	0	6	100	67	6	0	67

Примечание. Δ%* – прирост количества пациентов с наличием высокой экспрессии белка-маркера поражения почек в моче в I группе/ контрольной группе здоровых лиц; Δ%** – прирост количества пациентов с наличием высокой экспрессии белка-маркера поражения почек в моче в I группе/ II группе до операции; Δ%*** – прирост количества пациентов с наличием высокой экспрессии белка-маркера поражения почек в моче во II группе до операции/ контрольной группе здоровых лиц; Δ%**** – прирост количества пациентов с наличием высокой экспрессии белка-маркера поражения почек в моче в I группе/ II группе после операции; Δ%***** – прирост количества пациентов с наличием высокой экспрессии белка-маркера поражения почек в моче во II группе после операции/контрольной группе здоровых лиц.

почек и с ХБП II и более тяжелых стадий, которые отражают универсальные пути возникновения и прогрессирования поражения почек. К ним отнесли:

- белки, регулирующие СРО-АОС на уровне почечной ткани, участники систем детоксикации и элиминации (глицин-амидинотрансфераза);
- белки-участники метаболизма в нефроцитах

(амидинотрансфераза, агматиназа, лактатдегидрогеназа А, пируват-киназа, мышечная форма);

- белки, регулирующие клеточный рост, реакции протеолиза в клетке, процессинг нейрогормональных факторов, процессы ангиогенеза и адгезии клеток (толлоидоподобный белок 2, эритропоэтин, глутатион-S-трансфераза);

- белки, регулирующие активность рецепторных структур нефроцитов, сосудов почек (рецептор к эпидермальному фактору роста);
- структурные белки почечной ткани (уромодулин),
- белки-транскрипционные факторы, регулирующие активность ядра клетки (метил-СрG-связывающий белок 2, изоформа В);
- иммунные белки почечной ткани и белки-участники иммуновоспалительных процессов (комплемент С4В, пероксиредоксин 1, β -дефензин-1);
- транспортные белки (трансферрин, транситетин).

Молекулярные технологии анализа мочи у пациентов с раком почки различных стадий, размеров, характера роста и гистологической характеристики позволили выявить новые молекулы-маркеры ранней диагностики и прогрессирования онкопроцесса в почечной ткани, а также его метастазирования. Полученные нами данные о динамике протеомных паттернов мочи у пациентов с раком почки доказали существование универсальных молекулярных путей, ответственных за возникновение и прогрессирование поражения почечной ткани при данной патологии, а также молекулярных путей, ответственных за метастазирование опухолевых клеток. Протеомный анализ белков-маркеров рака почки у пациентов после проведения оперативного вмешательства выявил динамику их качественного состава, что позволит в перспективе выработать показания к выбору наиболее эффективной технологии оперативного лечения на основе полученных закономерностей молекулярного патогенеза рака почки. Качественный состав спектра белков мочи у здоровых лиц совпадал с качественным составом спектра белков мочи у пациентов с раком почки до и после операции по пунктам 2–30 табл. 1. Исключением является толлоидоподобный белок 2, экспрессия которого отсутствовала в моче у пациентов с раком почки до и после нефрэктомии.

Обнаружена высокая экспрессия белков в моче у пациентов с раком почки до операции, которые не идентифицировались в моче у здоровых лиц и у пациентов с ХГН: бетаин-гомоцистеин-метилтрансфераза 2, матриксная металлопротеиназа 2, матриксная металлопротеиназа 9, β 2-микроглобулин, кадгерин 1, аргининосукцинат-синтетаза, кальбиндин 1, глутатион-S-трансфераза, опухоль-ассоциированный ингибитор трипсина, пероксиредоксин 1, аннексин А5, кальпаин 11, энлаза 2, аннексин А4, цистатин В, альдолаза С, фибронектин.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время масс-спектрометрия считается наиболее востребованным и чувствительным методом анализа органических молекул, чему способствовало интенсивное развитие физики элементарных частиц и открытие новых методов ионизации молекул. Масс-спектрометрические методы хорошо подходят для анализа природных соединений, поскольку дают возможность получать информацию о точной молекулярной массе не только молекулы в целом, но и отдельных структурных ее фрагментов, а также способе их соединения и количественном содержании. Кроме того, по данным масс-спектра, можно сделать вывод относительно размера и структуры углеродных заместителей, что трудно установить другими методами. Масс-спектрометрия – физический метод измерения отношения массы заряженных частиц (ионов) к их заряду.

При оценке показателей лабораторных данных в сравнении с группой контроля было выявлено достоверные различия. Так, обнаружено достоверное снижение уровня эритроцитов и гемоглобина в группе пациентов с первичными ХГН на фоне более выраженной потери эритроцитов с мочой, чем при вторичных. Также обнаружено достоверно более выраженная протеинурия и более высокий уровень азотистых оснований при первичных гломерулонефритах, чем при вторичном (паранеопластическом) нефрите. Уровни С4 компонента комплемента также достоверно выше нормальных показателей в группе первичных хронических гломерулонефритов. СКФ была снижена в обеих группах, вместе с тем, достоверные различия с группой контроля наблюдались в группе первичных гломерулонефритов. Вероятно, перечисленные изменения обусловлены особенностью выборки.

Установленные белковые спектры мочи при первичных и вторичных ХГН представляют не только научный, но и практический интерес. В частности, последовательное изучение белкового спектра мочи у пациентов с гломерулонефритами позволит расширить представления о механизмах повреждения почечной ткани и в дальнейшем использовать обнаруженные белки в качестве потенциальных маркеров нефрита для прогнозирования скорости потери почечной функции, мониторингирования состояния пациента и оценки его в динамике. По уровню экспрессии того или иного белка, а также по изменению этого уровня можно будет судить о характере течения заболевания, активности процесса, эффективности терапии и об ответе на терапию. Благодаря этому станет возможным создание

эффективной системы прогнозирования скорости потери почечной функции.

Сравнительный анализ экспрессии белков в моче у пациентов с раком почки до и после операции продемонстрировал некоторые закономерности в динамике показателей экспрессии белков мочи различных функциональных групп. В частности, речь идет о метилСрG-связывающем белке 2, изоформе В, матриксной металлопротеиназе 9, матриксной металлопротеиназе 2, β_2 -микроглобулине, эритропоэтине, рецепторе к эпидермальному фактору роста, кадгерине 1, кальбиндине 1, глутатион-S-трансферазе, ЛДГ А, опухоль-ассоциированном ингибиторе трипсина, пероксиредоксине 1, аннексине А5, β -дефензине-1, кальпаине 11, уромодулине, энлазе 2, аннексине А4, фибронектине, РСБ, трансферрине. До операции отмечено увеличение экспрессии бетаин-гомоцистеин метилтрансферазы 2, аргининосукцинатсинтетазы, глицин-амидинотрансферазы и агматиназы.

Отсутствовала динамика после операции показателей экспрессии таких белков, как комплемент С4В, цистатин В, альдолаза С, пируваткиназа (мышечная форма).

Протеомный спектр мочи пациентов с раком почки до проведения операции позволил обнаружить маркеры прогрессирования онкологического процесса в почечной ткани и метастазирования опухолевых клеток, которые могут быть рекомендованы в качестве перспективных диагностических маркеров возникновения рака почки на самых ранних этапах. Обнаруженные молекулы-маркеры могут быть мишенями для разработки перспективных противоопухолевых лекарственных средств.

Изменения в молекулярном спектре белков мочи у пациентов с раком почки после проведения оперативного вмешательства показали его эффективность в отношении снижения экспрессии белков, регулирующих тонус сосудов и активность свертывающей и противосвертывающей систем крови, процессы кроветворения, в отношении системы СРО-АОС на уровне почечной ткани, участников систем детоксикации и элиминации, сократительных белков нефротелия, эндотелия почечных сосудов, участников метаболизма в нефроцитах, белков, регулирующих клеточный и опухолевый рост клетки, реакции протеолиза в клетке, процессинг нейрогормональных факторов, процессы ангиогенеза и адгезии клеток, белков, регулирующих активность рецепторных структур нефроцитов, сосудов почек, структурных белков почечной ткани, транскрипционных факторов, иммунных белков почечной ткани и транспорт-

ных белков по сравнению с контрольной группой здоровых лиц.

В ходе сравнительного анализа молекулярных паттернов мочи у пациентов с ХГН и раком почки после проведения оперативного вмешательства обнаружены общие закономерности в качественном составе белков мочи: отмечена высокая экспрессия таких белков в моче у пациентов обеих групп, как метилСрG-связывающий белок 2, изоформа В, глицин-амидинотрансфераза, агматиназа, ЛДГ А, комплемент С4В, β -дефензин-1.

Каждая молекула белка в функциональной группе взаимодействует с другими молекулами белков, реализуя межмолекулярные взаимодействия. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что существуют единые универсальные механизмы молекулярного патогенеза аутоиммунного и онкологического путей развития ХГН и рака почки, связанные с активацией белков, регулирующих СРО-АОС на уровне почечной ткани, участников систем детоксикации и элиминации, структурных белков почечной ткани, транскрипционных факторов, регулирующих активность ядра клетки, иммунных белков и белков-участников иммунно-воспалительных процессов в почечной ткани.

Уровень экспрессии полученных белков и их количественная оценка открывают перспективы оценки активности патологического процесса и на основании полученных данных создают возможности скрининговых подходов к прогнозированию и дифференциальной диагностике. Исследование белкового спектра мочи отражает обменные процессы непосредственно в мочеполовом тракте и сужает спектр белков, не фильтрующихся в мочу и встречающихся при других заболеваниях внутренних органов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ протеомного спектра мочи в группе пациентов с ХГН позволил выделить группы молекул белков, которые могут являться маркерами возникновения и прогрессирования заболевания, а также молекулярными мишенями для оценки нефропротективной терапии. Выявленные вещества участвуют в процессах воспаления и иммунного ответа. Характер их экспрессии позволяет предположить наличие универсальных механизмов поражения почек при первичном и вторичном, связанном с раком почки, ХГН. Расшифровка масс-спектрограмм мочи у пациентов позволила разделить белковый спектр на условные группы, что дает новые подходы к выявлению маркеров возникновения и прогрессирования ХБП.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК:

1. Батюшин ММ. Клиническая нефрология. ЗАО НПП «Джангар», Элиста, 2009; 656
2. Мухин НА. Диагностика и лечение болезней почек. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011; 383
3. Нефрология: национальное руководство. ГЭОТАР-Медиа, М., 2009; 716
4. Шилов ЕМ. Нефрология. ГЭОТАР-Медиа, М., 2010; 696
5. Официальный сайт Федеральной службы государственной статистики РФ, доступен на <http://www.gks.ru> (1 декабря 2011).
6. Паскалев Д, Танчева С. Клинико-лабораторные признаки, способствующие объективизации диагностики обострения хронического пиелонефрита. *Нефрология* 2007; (1): 5
7. Сарвилина ИВ. Междисциплинарные исследования в медицине (Мир биологии и медицины). Техносфера, М., 2007; 368
8. Рич Дж.П. Онкоурология. Бином, М., 2011; 896
9. Томилина НА, Бикбов БТ. Эпидемиология хронической почечной недостаточности и новые подходы к классификации и оценке тяжести хронических прогрессирующих заболеваний почек. *Тер арх* 2005; 77(6):87-92
10. Banks R, Dunn M, Hochstrasser D. Proteomics: New perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 2000; 356:1749–1756
11. Bowling CB, Muntner P. Epidemiology of Chronic Kidney Disease Among Older Adults: A Focus on the Oldest Old. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012; Sep 7 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22960475
12. Caiazzo RJJr, Maher AJ, Drummond MP, Lander CI, Tas-sinari OW, Nelson BP, Liu BCS. Protein microarrays as an application for disease biomarkers. *Proteomics Clin Appl* 3(2):138-147. [doi:10.1002/prca. 200800149]
13. Fassett RG, Venuthurupalli SK, Gobe GC, Coombes JS, Cooper MA, Hoy WE. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. *Kidney Int.* 2011 Oct;80(8):806-21. doi: 10.1038/ki.2011.198. Epub 2011 Jun 22. Review. PubMed PMID: 21697815.

Поступила в редакцию 20.06.2013 г.

Принята в печать 04.09.2013 г.